

PCT/JP00/06187

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

11.09.00

JP00/6187

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application:

1999年 9月13日

REC'D 27 OCT 2000

出 願 番 号
Application Number:

平成11年特許願第258771号

WIPO PCT

出 願 人
Applicant(s):

日水製薬株式会社

ETJU

10/070161

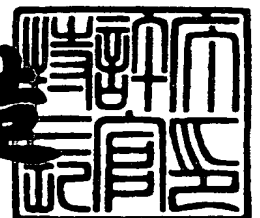
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年10月13日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2000-3083205

【書類名】 特許願
 【整理番号】 NSM0037
 【提出日】 平成11年 9月13日
 【あて先】 特許庁長官殿
 【国際特許分類】 G01N 33/53
 【発明者】

【住所又は居所】 茨城県結城市北南茂呂 1 0 7 5 - 2 日水製薬株式会社
 研究本部内

【氏名】 奥 裕一

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県結城市北南茂呂 1 0 7 5 - 2 日水製薬株式会社
 研究本部内

【氏名】 神谷 尚徳

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県結城市北南茂呂 1 0 7 5 - 2 日水製薬株式会社
 研究本部内

【氏名】 篠原 久美子

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県結城市北南茂呂 1 0 7 5 - 2 日水製薬株式会社
 研究本部内

【氏名】 柴原 裕亮

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県結城市北南茂呂 1 0 7 5 - 2 日水製薬株式会社
 研究本部内

【氏名】 上坂 良彦

【特許出願人】

【識別番号】 000226862

【氏名又は名称】 日水製薬株式会社

【代表者】 富本 善久

【代理人】

【識別番号】 100099139

【弁理士】

【氏名又は名称】 光来出 良彦

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 012209

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9707613

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 被測定物質の検出又は測定用キット、及び検出又は測定方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 2 価以上の結合性を有する被測定物質 A を検出あるいは測定するためのキットであって、下記の受容体 I、下記の受容体 II、並びに受容体 I、受容体 II 及び被測定物質からなる複合体を捕獲するための下記の固相複合体を包含することを特徴とするキット：

1) 物質 B 1 に対して結合性を有する物質 R 1 にマーカ M を結合させてなる化合物 R 1 - M と、被測定物質 A と結合性を有するリガンド L 1 と物質 B 1 を結合させてなる化合物 L 1 - B 1 を結合させてなる化合物 L 1 - B 1 - R 1 - M で表される受容体 I ；

2) 被測定物質 A と結合性を有するリガンド L 2 に被測定物質 A とは異なる結合性を有する物質 B 2 を導入してなる化合物 L 2 - B 2 と、物質 B 2 に対して結合性を有する物質 R 2 に該物質 B 2 とは異なる結合性を有する結合子 B 3 を結合させてなる化合物 R 2 - B 3 を予め結合させて得られた化合物 L 2 - B 2 - R 2 - B 3 で表される受容体 II ； 及び、

3) 結合子 B 3 に対して結合性を有する被結合子 R 3 を固相に結合させてなる化合物 R 3 - 固相で表される固相複合体。

【請求項 2】 タンパク質 P の一部を構成するリガンド L 3 に対して 2 価以上の結合性を有する被測定物質 A を検出あるいは測定するためのキットであって、下記の受容体 I、下記の受容体 II、並びに受容体 I、受容体 II 及び被測定物質からなる複合体を捕獲するための下記の固相複合体を包含することを特徴とするキット：

1) タンパク質 P にマーカ M を結合させた化合物 P - M で表される受容体 I ；

2) タンパク質 P あるいはリガンド L 3 に被測定物質 A とは異なる結合性を有する物質 B 2 を導入してなる化合物 P - B 2 あるいは L 3 - B 2 と、物質 B 2 に対して結合性を有する物質 R 2 に該物質 B 2 とは異なる結合性を有する結合子 B 3 を結合させてなる化合物 R 2 - B 3 を結合させて得られた化合物 P - B 2 - R

2-B3あるいはL3-B2-R2-B3で表される受容体II；及び、

3) 結合子B3に対して結合性を有する被結合子R3を固相に結合させてなる化合物R3-固相で表される固相複合体。

【請求項3】 2価以上の結合性を有する被測定物質Aを検出あるいは測定するためのキットであって、下記の受容体I、下記の受容体II、並びに受容体I、受容体II及び被測定物質からなる複合体を捕獲するための下記の固相複合体を包含することを特徴とするキット：

1) 物質B1に対して結合性を有する物質R1にマーカ-Mを結合させてなる化合物R1-Mと、被測定物質Aと結合性を有するリガンドL1と物質B1を結合させてなる化合物L1-B1を結合させてなる化合物L1-B1-R1-Mで表される受容体I；

2) 被測定物質Aと結合性を有するリガントL2に被測定物質Aとは異なる結合性を有する結合子B3を予め結合させて得られた化合物L2-B3で表される受容体II；及び、

3) 結合子B3に対して結合性を有する被結合子R3を固相に結合させてなる化合物R3-固相で表される固相複合体。

【請求項4】 前記固相複合体が、少なくとも前記受容体IIとは独立して存在している請求項1、2又は3記載のキット。

【請求項5】 前記2価以上の結合性を有する被測定物質Aが、DNA、RNA、抗原及び抗体の群から選ばれた物質である請求項1、2又は3記載のキット。

【請求項6】 前記リガンドL1、リガンドL2又はリガンドL3が、DNA、RNA、抗原、抗体、レクチン、糖タンパク質及び糖の群から選ばれた物質である請求項1、2又は3記載のキット。

【請求項7】 前記リガンドL1及びリガンドL2が同一の物質である請求項1又は3記載のキット。

【請求項8】 前記リガンドL1、L2及びリガンドL3が異なる配列を持つ物質である請求項1、2又は3記載のキット。

【請求項9】 前記物質B1と物質R1、あるいは物質B2と物質R2の結

合性は、解離定数として 10^{-8} から 10^{-16} (M) で示されるものである請求項 1、2 又は 3 記載のキット。

【請求項 10】 前記物質 B 1 及び／又は物質 B 2 がビオチンである請求項 1、2 又は 3 記載のキット。

【請求項 11】 前記物質 B 1 及び／又は物質 B 2 が DNA、RNA、抗原、抗体、レクチン、糖タンパク質及び糖の群から選ばれた物質である請求項 1、2 又は 3 記載のキット。

【請求項 12】 前記物質 R 1 及び／又は物質 R 2 がストレプトアビジン及びアビジンの群から選ばれた物質である請求項 1、2 又は 3 記載のキット。

【請求項 13】 前記物質 R 1 及び／又は物質 R 2 が抗原、抗体、DNA、RNA、レクチン、糖タンパク質及び糖の群から選ばれた物質である請求項 1、2 又は 3 記載のキット。

【請求項 14】 前記物質 R 1 及び物質 R 2 が同一物質である請求項 1 記載のキット。

【請求項 15】 前記物質 R 1 及び物質 R 2 が異なる物質である請求項 1 記載のキット。

【請求項 16】 前記結合子 B 3 と被結合子 R 3 は、DNA 又は RNA の少なくとも一部分の相補的結合により結合可能なものである請求項 1、2 又は 3 記載のキット。

【請求項 17】 前記マーカー M が着色色素、蛍光色素、発光性物質、金属コロイド、ラテックス、リポソーム、放射性同位元素、酵素、DNA 及び RNA の群から選ばれた物質である請求項 1、2 又は 3 記載のキット。

【請求項 18】 前記固相がポリスチレン、ニトロセルロース、ナイロン、セルロース及びガラスの群から選ばれた物質である請求項 1、2 又は 3 記載のキット。

【請求項 19】 ストレプトアビジン又はアビジンに、金属コロイド又は酵素を結合させた物質と、ビオチン結合リガンドなる物質を、ビオチンと、アビジン又はストレプトアビジンとの特異的結合反応により結合させた物質。

【請求項 20】 2 価以上の結合性を有する被測定物質 A を検出又は測定す

る方法であって、

- 1) 被測定物質 A を、
- 2) 物質 B 1 に対して結合性を有する物質 R 1 にマーカ M を結合させてなる化合物 R 1 - M と、上記被測定物質 A と結合性を有するリガンド L 1 と物質 B 1 を結合させてなる化合物 L 1 - B 1 を結合させてなる化合物 L 1 - B 1 - R 1 - M で表される受容体 I、並びに、

3) 被測定物質 A と結合性を有するリガント L 2 に被測定物質 A とは異なる結合性を有する物質 B 2 を導入してなる化合物 L 2 - B 2 と、物質 B 2 に対して結合性を有する物質 R 2 に該物質 B 2 とは異なる結合性を有する結合子 B 3 を結合させてなる化合物 R 2 - B 3 を予め結合させて得られた化合物 L 2 - B 2 - R 2 - B 3 で表される受容体 II と接触させて反応させて複合体を生成し、

4) 前記生成した複合体を、結合子 B 3 に対して結合性を有する被結合子 R 3 を固相に結合させてなる化合物 R 3 - 固相で表される固相複合体により捕獲し、

5) 捕獲された複合体中のマーカ M を検出又は測定することを特徴とする被測定物質を検出又は測定する方法。

【請求項 2 1】 タンパク質 P の一部を構成するリガンド L 3 に対して 2 価以上の結合性を有する被測定物質 A を検出又は測定する方法であって、

- 1) 被測定物質 A を、
- 2) タンパク質 P にマーカ M を結合させた化合物 P - M で表される受容体 I、並びに
- 3) タンパク質 P あるいはリガンド L 3 に被測定物質 A とは異なる結合性を有する物質 B 2 を導入してなる化合物 P - B 2 あるいは L 3 - B 2 と、物質 B 2 に対して結合性を有する物質 R 2 に該物質 B 2 とは異なる結合性を有する結合子 B 3 を結合させてなる化合物 R 2 - B 3 を結合させて得られた化合物 P - B 2 - R 2 - B 3 あるいは L 3 - B 2 - R 2 - B 3 で表される受容体 II と接触させて反応させて複合体を生成し、
- 4) 前記生成した複合体を、結合子 B 3 に対して結合性を有する被結合子 R 3 を固相に結合させてなる化合物 R 3 - 固相で表される固相複合体により捕獲し、
- 5) 捕獲された複合体中のマーカ M を検出又は測定することを特徴とする被

測定物質を検出又は測定する方法。

【請求項 2 2】 2 価以上の結合性を有する被測定物質 A を検出又は測定する方法であって、

1) 被測定物質 A を、

2) 物質 B 1 に対して結合性を有する物質 R 1 にマーカ M を結合させてなる化合物 R 1 - M と、上記被測定物質 A と結合性を有するリガンド L 1 と物質 B 1 を結合させてなる化合物 L 1 - B 1 を結合させてなる化合物 L 1 - B 1 - R 1 - M で表される受容体 I、並びに、

3) 被測定物質 A と結合性を有するリガント L 2 に被測定物質 A とは異なる結合性を有する結合子 B 3 を予め結合させて得られた化合物 L 2 - B 3 で表される受容体 II と接触させて反応させて複合体を生成し、

4) 前記生成した複合体を、結合子 B 3 に対して結合性を有する被結合子 R 3 を固相に結合させてなる化合物 R 3 - 固相で表される固相複合体により捕獲し、

5) 捕獲された複合体中のマーカ M を検出又は測定することを特徴とする被測定物質を検出又は測定する方法。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、液体試料中に包含される 2 価以上の結合性を有する被測定物質を検出あるいは測定するキットであって、被測定物質に特異的に結合するリガンドに対して直接結合してマーカにて標識するか、あるいは間接的に結合してマーカにて標識してなるリガンド・マーカ複合体と、被測定物質に特異的に結合するリガンドを固相に結合するための結合子とを含むリガンド・結合子複合体と、該リガンド・結合子複合体を、固相に捕獲するための被結合子を結合させた固相とを含むことからなるキット、及び検出又は測定方法に関する。

【0 0 0 2】

【従来の技術】

液体試料中に包含される抗体などリガンドに対する 2 価以上の結合性を有する物質を検出あるいは測定する方法には、次の方法が知られている。すなわち、リ

ガンドを酵素などのマーカーで標識したものと、固相にリガンドを結合させたものを準備しておき、前記リガンドをマーカーで標識したものと、液体試料中の抗体とを反応させる。次いでこの溶液を前記リガンド結合固相と反応させて、固相に結合したマーカーの有無を検出あるいは量を測定する方法である（例えば、特開平 9-229938 号公報）。この方法では、同じリガンドに対する抗体が標識リガンドに予め反応してしまうために、固相化されたりガンドに反応しなくなり、感度が高くない場合が多かった。

【0003】

そのため、特許第 2532788 号公報にあるように、捕獲種 (R) を固相に結合させておき、第一の免疫学的物質 (I1) と検出可能な同位体 (M) との結合生成物からなる分散された第一の粒子の第一のバッチ (M-I1) と、第2の免疫反応性物質 (I2) と捕獲可能種 (B) との第2の結合生成物からなる分散された第2の粒子の第2のバッチ (I2-B) とを、免疫反応性分析物 (G) を介して結合させて複合体 (M-I1-G-I2-B) を形成させ、固相に結合させた捕獲種 (R) と反応させて、免疫反応性分析物の介在あるいは量を評価する方法があった。この方法では、第一の免疫学的物質 (I1) と第二の免疫学的物質 (I2) を同一のものを用いることにより、第一の免疫学的物質 (I1) と検出可能な同位体 (M) 同志で免疫反応性分析物 (G) が結合せずに、第一の免疫学的物質 (I1) と第2の免疫反応性物質 (I2) が、同時に免疫反応性分析物 (G) と反応するために感度が高いという特色がある。

【0004】

さらに、特開平 10-253632 号公報には、オリゴヌクレオチド (ON) を固相化しておき、そのオリゴヌクレオチド (ON) と相補的なオリゴヌクレオチド (ON') で標識されたりガンド (L) (例えば、抗原又は抗体) と、マーカー標識化リガンド (M-L) とを、リガンド L 対して結合する分析物 (A) に対して反応させ、複合体 (ON-L-A-L-M) を形成させて、オリゴヌクレオチド結合固相と該複合体中に含まれるオリゴヌクレオチド同志の相補的な結合により、固相に複合体を結合させることによりマーカー (M) の有無、量により分析物を評価する方法が示されている。この方法では、分析物 (A) とマーカー

標識化リガンド (M-L) が先に複合体を形成せずに、ON'-LとM-Lが同時に分析物 (A) と反応するために、特許第 2532788 号公報の方法と同様に感度が高いという特性を有する。さらにこの方法では、固相化するオリゴヌクレオチド、対応するリガンド (L) に結合させるオリゴヌクレオチドをそれぞれ配列を変化させることにより複数の分析対象物を同時に測定することが可能になる。

【0005】

前記特許第 2532788 号公報あるいは特開平 10-253632 号公報の方法のように感度高く、測定対象物を検出あるいは測定するには、第一あるいは第二の免疫反応性物質、あるいは配位子を何らかの結合子で標識する必要がある。

【0006】

しかしながら、前記免疫反応性物質あるいはリガンド (L) を直接結合子で標識する場合、標識化工程の途中における標識化リガンド (L) の精製過程で、リガンド (L) の物性が変化して不溶化しやすく、結合子標識化配位子 (例えば、結合子で標識された抗原) の回収率が著しく低下する場合があった。

【0007】

一方、低分子のペプチドをリガンド (L) として直接標識する際に標識されたペプチドは回収されるものの、立体配置による障害と思われる免疫化学的反応性の低下が起きることもあった。さらに、低分子のペプチドを金属コロイド、着色ラテックスなどで標識しようとした場合、低分子であるが故に、標識ができないといったこともあった。

【0008】

特許第 2501960 号公報には、マーカーで標識化された特異的結合能を有する物質 P2 (例えば、アビジン、ストレプトアビジン) と、マーカーで標識化されていない特異的結合能を有する物質 P2 と、P2 に対する 1 価の結合成分 P1 (例えば、ビオチン) とリガンド R1 を結合させた化合物 P1-R1、及び、前記マーカーで標識されていない物質 P2 が固相に結合されたものからなる試薬が示されている。該試薬は、複合体あたりのリガンド量を調整することができな

いため、あるいは、固相との反応がビオチン-アビジンによる結合性であり、強固な結合性であるため、試薬の感度をコントロールすることが困難という問題がある。そのため、他の要因による極微量な免疫物質に対しても反応してしまい、好ましくない判定結果をもたらす場合もある。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】

そこで、本発明の目的は、抗体などのリガンドに対して2価以上の結合性を有する、液体試料中に包含される分析対象物質を検出あるいは測定するキットであって、簡易に検出あるいは測定でき、キットを製造する際の収率が高く、低分子量のリガンドや、高分子量のリガンドであっても、さらにはタンパク質の一部を構成するリガンドであって、容易に標識することができ、例えば、リガンドにマーカ-を標識させる場合にリガンドが低分子化合物であっても、収率よくリガンド・マーカ-複合体を製造することができ、キット中に含まれるリガンドの量の調整を可能とすることにより、あるいは、固相と複合体との結合性を変化させることができ、その結合性を変化させることにより試薬の感度をコントロールすることができるキットを提供すること、被測定物質の検出又は測定方法を提供することである。

【0010】

【課題を解決するための手段】

本発明は、上記課題を解決するために下記のようなキットを構成することからなる。

【0011】

本発明の1番目の型式のキットは、2価以上の結合性を有する被測定物質Aを検出あるいは測定するためのキットであって、下記の受容体I、下記の受容体II、並びに受容体I、受容体II及び被測定物質からなる複合体を捕獲するための下記の固相複合体を包含することを特徴とするキットである。

【0012】

1) 物質B1に対して結合性を有する物質R1にマーカ-Mを結合させてなる化合物R1-Mと、被測定物質Aと結合性を有するリガンドL1と物質B1を結

合させてなる化合物 $L 1 - B 1$ を結合させてなる化合物 $L 1 - B 1 - R 1 - M$ で表される受容体 I ;

2) 被測定物質 A と結合性を有するリガンド $L 2$ に被測定物質 A とは異なる結合性を有する物質 $B 2$ を導入してなる化合物 $L 2 - B 2$ と、物質 $B 2$ に対して結合性を有する物質 $R 2$ に該物質 $B 2$ とは異なる結合性を有する結合子 $B 3$ を結合させてなる化合物 $R 2 - B 3$ を予め結合させて得られた化合物 $L 2 - B 2 - R 2 - B 3$ で表される受容体 II ; 及び、

3) 結合子 $B 3$ に対して結合性を有する被結合子 $R 3$ を固相に結合させてなる化合物 $R 3 -$ 固相で表される固相複合体。

【 0 0 1 3 】

本発明の 2 番目の型式のキットは、タンパク質 P の一部を構成するリガンド $L 3$ に対して 2 価以上の結合性を有する被測定物質 A を検出あるいは測定するためのキットであって、下記の受容体 I、下記の受容体 II、並びに受容体 I、受容体 II 及び被測定物質からなる複合体を捕獲するための下記の固相複合体を包含することを特徴とするキットである。

【 0 0 1 4 】

1) タンパク質 P にマーカ - M を結合させた化合物 $P - M$ で表される受容体 I

;

2) タンパク質 P あるいはリガンド $L 3$ に被測定物質 A とは異なる結合性を有する物質 $B 2$ を導入してなる化合物 $P - B 2$ あるいは $L 3 - B 2$ と、物質 $B 2$ に対して結合性を有する物質 $R 2$ に該物質 $B 2$ とは異なる結合性を有する結合子 $B 3$ を結合させてなる化合物 $R 2 - B 3$ を結合させて得られた化合物 $P - B 2 - R 2 - B 3$ あるいは $L 3 - B 2 - R 2 - B 3$ で表される受容体 II ; 及び、

3) 結合子 $B 3$ に対して結合性を有する被結合子 $R 3$ を固相に結合させてなる化合物 $R 3 -$ 固相で表される固相複合体。

【 0 0 1 5 】

本発明のキットにおいて、固相複合体は、少なくとも受容体 II とは独立して存在している。即ち、測定前では固相複合体は、受容体 II 及び受容体 I と独立した組み合わせのキットであるか、あるいは、受容体 II と独立し、受容体 I と同じ系

の組み合わせのキットであってもよい。

【 0 0 1 6 】

本発明の 3 番目の型式のキットは、2 価以上の結合性を有する被測定物質 A を検出あるいは測定するためのキットであって、下記の受容体 I、下記の受容体 II、並びに受容体 I、受容体 II 及び被測定物質からなる複合体を捕獲するための下記の固相複合体を包含することを特徴とするキットである。

【 0 0 1 7 】

1) 物質 B 1 に対して結合性を有する物質 R 1 にマーカ－M を結合させてなる化合物 R 1 - M と、被測定物質 A と結合性を有するリガンド L 1 と物質 B 1 を結合させてなる化合物 L 1 - B 1 を結合させてなる化合物 L 1 - B 1 - R 1 - M で表される受容体 I ；

2) 被測定物質 A と結合性を有するリガント L 2 に被測定物質 A とは異なる結合性を有する結合子 B 3 を予め結合させて得られた化合物 L 2 - B 3 で表される受容体 II ；及び、

3) 結合子 B 3 に対して結合性を有する被結合子 R 3 を固相に結合させてなる化合物 R 3 - 固相で表される固相複合体。

【 0 0 1 8 】

本発明のキットにおいて、2 価以上の結合性を有する被測定物質 A は、DNA、RNA、抗原及び抗体の群から選ぶことができる。

【 0 0 1 9 】

本発明のキットにおいて、リガンド L 1 とリガンド L 2 が同一物質（例えば、アビジン同士、又はストレプトアビジン同士）であっても、異なる配列を持つ物質（例えば、配列の異なる DNA 同士又は RNA 同士の組み合わせ、あるいはアビジンとストレプトアビジンの組み合わせ）であってもよい。

【 0 0 2 0 】

本発明のキットにおいて、リガンド L (L 1、L 2、L 3) は、DNA、RNA、抗原、抗体、レクチン、糖タンパク質及び糖の群から選ぶことができる。

【 0 0 2 1 】

本発明のキットにおいて、物質 R 1 及び／又は物質 R 2 は、ストレプトアビジ

ン、アビジン、抗原、抗体、DNA、RNA、レクチン、糖タンパク質及び糖の群から選ぶことができる。

【0022】

本発明のキットにおいて、物質R1と物質R2が同一物質（例えば、アビジン同士、又はストレプトアビジン同士）であっても、異なる物質（例えば、アビジンとストレプトアビジン）であってもよい。

【0023】

本発明のキットにおける、物質B1及び／又は物質B2は、ビオチン、DNA、RNA、抗原、抗体、レクチン、糖タンパク質及び糖の群から選ばれた物質が使用できる。本発明のキットにおいて、代表的な例には、物質B1及び／又は物質B2にビオチンが使用される場合である。このような場合には、物質R1と物質R2にアビジン同士、及び／又はストレプトアビジン同士が使用される。

【0024】

本発明のキットにおける、物質B1と物質R1、あるいは物質B2と物質R2の結合性は、解離定数として 10^{-8} から 10^{-16} (M) の範囲が好ましい。

【0025】

本発明のキットにおいて、マーカーには、例えば、着色色素、蛍光色素、発光性物質、金属コロイド、ラテックス、リポソーム、放射性同位元素、酵素、DNA及びRNAなる群から選ばれた物質を使用することができる。

【0026】

本発明で使用される固相には、ポリスチレン、ニトロセルロース、ナイロン、セルロース及びガラスの群から選ばれた物質が好適に使用される。

【0027】

本発明の被測定物質Aを検出又は測定するための1番目の型式のキット使用する検出又は測定方法は、2価以上の結合性を有する被測定物質Aを検出又は測定する方法であって、

- 1) 被測定物質Aを、
- 2) 物質B1に対して結合性を有する物質R1にマーカーMを結合させてなる化合物R1-Mと、上記被測定物質Aと結合性を有するリガンドL1と物質B1

を結合させてなる化合物 $L1-B1$ を結合させてなる化合物 $L1-B1-R1-M$ で表される受容体 I、並びに、

3) 被測定物質 A と結合性を有するリガント $L2$ に被測定物質 A とは異なる結合性を有する物質 $B2$ を導入してなる化合物 $L2-B2$ と、物質 $B2$ に対して結合性を有する物質 $R2$ に該物質 $B2$ とは異なる結合性を有する結合子 $B3$ を結合させてなる化合物 $R2-B3$ を予め結合させて得られた化合物 $L2-B2-R2-B3$ で表される受容体 II と接触させて反応させて複合体を生成し、

4) 前記生成した複合体を、結合子 $B3$ に対して結合性を有する被結合子 $R3$ を固相に結合させてなる化合物 $R3$ -固相で表される固相複合体により捕獲し、

5) 捕獲された複合体中のマーカー M を検出又は測定することを特徴とする方法である。

【0028】

本発明の被測定物質 A を検出又は測定するための 2 番目の型式のキットを使用する検出又は測定方法は、タンパク質 P の一部を構成するリガンド $L3$ に対して 2 価以上の結合性を有する被測定物質 A を検出又は測定する方法であって、

1) 被測定物質 A を、

2) タンパク質 P にマーカー M を結合させた化合物 $P-M$ で表される受容体 I、並びに

3) タンパク質 P あるいはリガンド $L3$ に被測定物質 A とは異なる結合性を有する物質 $B2$ を導入してなる化合物 $P-B2$ あるいは $L3-B2$ と、物質 $B2$ に対して結合性を有する物質 $R2$ に該物質 $B2$ とは異なる結合性を有する結合子 $B3$ を結合させてなる化合物 $R2-B3$ を結合させて得られた化合物 $P-B2-R2-B3$ あるいは $L3-B2-R2-B3$ で表される受容体 II と接触させて反応させて複合体を生成し、

4) 前記生成した複合体を、結合子 $B3$ に対して結合性を有する被結合子 $R3$ を固相に結合させてなる化合物 $R3$ -固相で表される固相複合体により捕獲し、

5) 捕獲された複合体中のマーカー M を検出又は測定することを特徴とする方法である。

【0029】

本発明の被測定物質 A を検出又は測定するための 3 番目の型式のキット使用する検出又は測定方法は、2 価以上の結合性を有する被測定物質 A を検出又は測定する方法であって、

1) 被測定物質 A を、

2) 物質 B 1 に対して結合性を有する物質 R 1 にマーカ M を結合させてなる化合物 R 1 - M と、上記被測定物質 A と結合性を有するリガンド L 1 と物質 B 1 を結合させてなる化合物 L 1 - B 1 を結合させてなる化合物 L 1 - B 1 - R 1 - M で表される受容体 I、並びに、

3) 被測定物質 A と結合性を有するリガント L 2 に被測定物質 A とは異なる結合性を有する結合子 B 3 を予め結合させて得られた化合物 L 2 - B 3 で表される受容体 II と接触させて反応させて複合体を生成し、

4) 前記生成した複合体を、結合子 B 3 に対して結合性を有する被結合子 R 3 を固相に結合させてなる化合物 R 3 - 固相で表される固相複合体により捕獲し、

5) 捕獲された複合体中のマーカ M を検出又は測定することを特徴とする被測定物質を検出又は測定する方法である。

【0030】

上記の被測定物質 A を検出又は測定する 3 つの方法において、前記各 1) ~ 3) の要件による複合体を形成する方法は、1 工程で同時に反応を進行させて実施してもよいし、複数工程で接触させる順序を変えて順次実施してもよい。

【0031】

図 1 は、本発明の 1 番目の型式のキットの構成成分の実施の態様を図示したものである。各枠毎の成分は、キットの保存時には別体に保存されることを示す。図 2 は、該キットを用いて被測定物質 A を固相に捕獲した状態を示す。図 3 は、本発明のキットのうちの試薬成分を製造するためのフロー図であり、詳しくは、化合物 L 1 - B 1 - R 1 - M で表される受容体 I と、化合物 L 2 - B 2 - R 2 - B 3 で表される受容体 II の調製フロー図である。

【0032】

本発明の 1 番目の型式のキットに使用される化合物 L 1 - B 1 - R 1 - M (受容体 I) の実施の態様において、物質 R 1 としてストレプトアビジン又はアビジ

ンを使用し、マーカーMとして金属コロイド又は酵素を結合させた物質を使用し、化合物L1-B1としてのビオチン結合リガンドなる物質を、ビオチンと、アビジン又はストレプトアビジンとの特異的結合反応により結合させてなる化合物は、新規物質として特徴がある。

【0033】

本発明の1番目の型式のキットは、リガンドL1が水溶性の場合にも適用できるが、特に、不溶性が高い場合に好適である。不溶性の高いリガンドL1は、直接標識すると不溶性の性質が複合体に付与されてしまい、非特異反応の原因となる場合がある。しかしながら、例えば、親水性が比較的高いアビジンあるいはストレプトアビジンなどの物質R1又はR2と結合することにより、複合体となった化合物L1-B1-R1-M（受容体I）あるいは化合物L2-B2-R2-B3（受容体II）を全体として親水性にすることが可能となり、非特異反応の発生を防止できる。

【0034】

なお、リガンドL1がどのような物質であっても、キットを構成する各複合体を調製するのに、ビオチン-アビジン反応を用いた場合には、複合体調製時の条件が一定にできる。このことにより、省力化が可能となる。本発明では予め複合体としてのL2-B2-R2-B3（受容体II）を調製している。そのため、複合体当たりリガンド量をコントロールできる。このことにより、試薬の感度をコントロールすることができる。

【0035】

図4は、本発明の2番目の型式のキットの構成成分の実施の態様を図示したものである。各枠毎の成分は、キットの保存時には別体に保存されることを示す。図5は、該キットを用いて被測定物質Aを固相に捕獲した状態を示す。本発明の2番目の型式のキットは、リガンドL2が低分子ではなく、水溶性の高分子、例えば、水溶性タンパク質である場合に好適である。このようなタンパク質をリガンドL2とする場合には、リガンドL2はマーカーMで直接標識可能である。

【0036】

図6は、本発明の3番目の型式のキットの構成成分の実施の態様を図示したも

のである。各枠毎の成分は、キットの保存時には別体に保存されることを示す。図 7 は、該キットを用いて被測定物質 A を固相に捕獲した状態を示す。本発明の 3 番目の型式のキットは、被測定物質 A が、DNA 又は RNA のオリゴヌクレオチドの測定に好適であり、この場合、リガンド L 1 は被測定物質 A のオリゴヌクレオチドの一方の端部の配列に対して少なくとも相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドであり、リガンド L 2 は被測定物質 A のもう一方の端部の配列に対して少なくとも相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドである。さらに、この場合、リガンド L 2 の被測定物質 A の結合側とは反対の端部の配列は、固相に結合された DNA 又は RNA のオリゴヌクレオチドの配列に対して少なくとも相補的である。

【 0 0 3 7 】

【発明の実施の態様】

本発明の技術的意義を次に発明の実施の態様に基づいて説明する。

【 0 0 3 8 】

アビジン又はストレプトアビジンと、ビオチンの結合は 10^{-15} (M) という結合定数を示し一般的な免疫反応の結合定数の 100 倍以上の良好な結合性を示す。この結合は 6 - 8 M グアニジン、pH 1.5、120℃ の条件下 15 分間で解離することが報告されており (Green, N.: Purification of Avidin, in Methods in Enzymology, XVIII, (McCormick, D., and Wright, L., eds.), Academic Press, NY, 414 (1970).)、常温では極めて安定な結合体が形成される。

【 0 0 3 9 】

R 1 又は R 2 としてアビジン又はストレプトアビジンを用いた、本発明の 1 番目の型式のキットの具体例について説明する。R 1 又は R 2 としてのアビジン又はストレプトアビジンと、B 1 又は B 2 としてのビオチン等の強固な結合を利用してリガンド L 1 とマーカ M を結合させてなる化合物 L 1 - B 1 - R 1 - M で表される受容体 I、あるいはリガンド L 2 と結合子 B 3 としてのオリゴヌクレオチドを結合させてなる化合物 L 2 - B 2 - R 2 - B 3 で表される受容体 II が使用できる。

【 0 0 4 0 】

前記受容体 I の調製は、あらかじめリガンド L 1 に物質 B 1 としてのビオチンを導入したもの（化合物 L 1-B 1）と、物質 R 1 としてのアビジン又はストレプトアビジンにマーカー M を結合させたもの（化合物 R 1-M）を調製しておき、これらの化合物におけるアビジン又はストレプトアビジン R 1 とビオチン B 1 との結合により、化合物 L 1-B 1-R 1-M なる複合体（受容体 I）を極めて容易に、安定に調製することが可能となる。このようにして得られた複合体は、
 実質的にリガンド L 1 をマーカー M で標識したものである。

【0041】

この方法により調製した複合体である化合物 L 1-B 1-R 1-M（受容体 I）は、マーカー M が、例えば、アビジン又はストレプトアビジン（R 1）に結合し、さらに、例えば、アビジン又はストレプトアビジン（R 1）にビオチン化リガンド（化合物 L 1-B 1）が結合したものである。したがって、リガンド L 1 が低分子量のペプチドなどの立体障害的な影響を受けやすい物質であっても、マーカー M は高分子であるアビジン又はストレプトアビジン（R 1）を介在して結合しているので、こうした影響を受けにくい。また、リガンド L 1 がマーカー M に直接結合できないような物質であっても、この方法によれば、確実にリガンド L 1 とマーカー M の複合体が調製できる。

【0042】

なお、リガンド L 3 が立体障害が生じないような比較的安定な物質である場合、即ち、タンパク質 P の一部を構成するリガンド L 3 には、マーカー M はリガンド L 3 或いはリガンド L 3 を含むタンパク質 P に直接結合させて化合物 P-M をリガンド-マーカー複合体（受容体 I）として用いることができる（本発明の 2 番目の型式のキット）。

【0043】

物質 B 1 と物質 B 2 が同一で、リガンド L 1 と L 2 が同一の場合には、次の方法で、本発明の 1 番目の型式のキットの調製が容易となる。本発明における受容体 II、即ち、リガンド L 2 と結合子 B 3 とを複合させた化合物（L 2-B 2-R 2-B 3）を調製するには、結合子 B 3 として、例えば、オリゴヌクレオチド ON を用いる場合には、予め、物質 R 2 とオリゴヌクレオチド ON（結合子 B 3）

を結合させたもの（化合物 $R2-ON$ ）を準備しておき、受容体 I（ $L1-B1-R1-M$ ）を調製したときに準備した化合物 $L1-B1$ （ただし、 $L1-B1$ は $L2-B2$ と同一化合物である）を前記化合物 $R2-ON$ と反応させて、化合物 $L2-B2-R2-ON$ なる複合体（受容体 II）を調製する。この方法によって、リガンド $L2$ とヌクレオチド ON （結合子 $B3$ ）を含む複合体を調製することが可能となる。

【0044】

この方法によれば、リガンド $L2$ が低分子量のペプチドなどの標識が難しい物質であっても、物質 $R2$ （例えば、ストレプトアビジン、アビジン、抗原、抗体、DNA、RNA、レクチン、糖タンパク質及び糖の群から選ばれた物質）と、物質 $B2$ の介在により、確実にリガンド $L2$ とヌクレオチド ON （結合子 $B3$ ）との複合体が調製できる。

【0045】

本発明の 1 番目の型式のキットを構成するには、図 3 のフロー図に示すように、化合物 $R1-M$ と化合物 $R2-B3$ （例えば、 $R2-ON$ ）を予め準備しておき、且つ、化合物 $L1-B1$ （但し、化合物 $L1-B1$ と化合物 $L2-B2$ とは同一化合物の場合）を共通に使用して、リガンド $L1$ とマーカ- M の複合体、即ち、 $L1-B1-R1-M$ で表される受容体 I、およびリガンド $L2$ と結合子 $B3$ （例えば、オリゴヌクレオチド ON ）の複合体、即ち、化合物 $L2-B2-R2-B3$ で表される受容体 II の調製することにより、本発明の 1 番目の型式のキットを極めて容易に調製することができる。

【0046】

さらに、物質 $R1$ 又は物質 $R2$ として用いられるアビジン又はストレプトアビジンは物質 $B1$ 又は物質 $B2$ としてのビオチンとの結合部位を 1 分子あたり 4 個保有しているため、リガンド $L1$ 又はリガンド $L2$ の導入比を、アビジン又はストレプトアビジン当たり 1 から 4 個の間で変化させることが可能で、この導入率を制御することにより反応性、感度をコントロールすることも可能となる。

【0047】

リガンド $L1$ 又はリガンド $L2$ が疎水性の強い物質である場合、リガンド $L1$

にマーカーMを、あるいはリガンドL 2にオリゴヌクレオチドONなどの結合子B 3を直接導入すると、さらに物性が変化し、疎水性がさらに強まり非特異的な結合の原因になる場合も少なくない。しかしながら、本発明の1番目の型式のキットのように、リガンドービオチンと、アビジンーマーカーあるいはアビジンー結合子とを結合させる場合には、リガンドとマーカーの複合体あるいはリガンドと結合子の複合体を調製する際には、アビジンが親水性に富んでいるためリガンドの疎水性をアビジンと結合することによって軽減でき、疎水性に由来する非特異的な反応を除去することも可能である。また、上述したようにアビジンとリガンドービオチンの導入比を変化させることにより、こちらの方からも反応性を制御することが可能である。

【0048】

以上の説明は主として本発明の1番目の型式のキットについてのものであるが、本発明の2番目の型式のキットについては1番目の型式のキットと同様なことが言える。

【0049】

本発明の検出又は測定のためのキット及びその検出又は測定方法によれば、固相に複合体を捕獲するために、結合子B 3と被結合子R 3を結合させたものを用いており、これらの結合を種々の結合性の異なる組み合わせの物質を採用することにより、結合性の強弱を変化させることができ、即ち、試薬の感度をコントロールすることができる。例えば、レクチンー糖の結合反応では、ビオチンーアビジン結合反応よりもはるかに反応性が低いため、B 3とR 3にレクチンー糖を用いれば、ビオチンーアビジン反応を用いたものよりも、より多くの抗原あるいは抗体が無ければ反応しないキットを構成することが可能となる。

【0050】

結合子B 3と被結合子R 3を少なくとも一部が相補的な配列をもつRNA、DNAのオリゴヌクレオチドを使用して結合する場合には、オリゴヌクレオチドの相補的配列の長短を変化させることにより、結合性の強弱をコントロールすることができ、試薬の感度をコントロールすることができる。

【0051】

本発明の検出又は測定のためのキット及びその検出又は測定方法によれば、固相化するオリゴヌクレオチド、対応する配位子に結合させるオリゴヌクレオチドの組み合わせを複数個用意し、それぞれの組み合わせに対応させた複数の分析対象物に特異的に結合するリガンドを選択してキットを構成することにより、複数の分析対象物を同時に検出又は測定することが可能になる。

【0052】

図8は、リガンドL1とリガンドL2が異なる配列を持つ物質である場合の本発明のキットを用い、被測定物質Aと反応させ、受容体I、受容体II及び被測定物質からなる複合体を固相複合体に捕獲した状態を示す。具体的には、図8で示す被測定物質Aは、RNA又はDNAのオリゴヌクレオチドである。該オリゴヌクレオチドの両端の配列に対して相補的な配列を有する、一方のオリゴヌクレオチドをリガンドL1とし、他方のオリゴヌクレオチドをリガンドL2としている。図8の態様を構成するキットの構成要素は、前記本発明の1番目の型式のキットと同じである。

【0053】

【実施例】

〔実施例1〕

オリゴヌクレオチドの合成

5 ‘末端にアミノ基を有する以下のようなオリゴヌクレオチドをパーキンエルマー社製DNA合成装置391Aを用いて、それぞれ合成した。一部のものは、サワディーテクノロジー社に合成を依頼した。

アミノ基-GAA TTC CCG GGG ATC CGT CG (以下「ペア1+」という)

アミノ基-CGA CGG ATC CCC GGG AAT TC (以下「ペア1-」という)

アミノ基-AAC GGA ATC TAA TCA GGA GG (以下「ペア8+」という)

アミノ基-CCT CCT GAT TAG ATT CCG TT (以下「ペア8-」という)

アミノ基-CCG ACT ACA GAA GAG GAG AA (以下「ペア7+」という)

〔実施例2〕

HCV抗体、TP検出用オリゴヌクレオチド標識IgGの調製

ウサギIgGにペア8-を導入した。すなわち、ウサギIgG 25mgを含む0.1M ホウ酸ナトリウム緩衝液2mlと、IgGの50~100倍モル過剰のSATA (ピアス社製)を37℃で1時間反応させた。反応後、終濃度0.1M Tris塩酸緩衝液、0.1Mヒドロキシルアミンになるようにそれぞれの試薬を添加して、37℃で1時間反応させ、この後SephadexG-25 (アマシャム ファルマシア バイオテック社製)を充填したカラムにアプライし、SH導入ウサギIgGを調製した。一方、ペア8-1000nmolを溶解した、5mMEDTAを含む0.1MMOPS緩衝液pH7.0に、オリゴヌクレオチドの50倍モル過剰のEMCS (同仁化学社製)を添加し、37℃で1時間反応させた。反応後、常法に従ってエタノール沈殿、洗浄を行い、マレイミド基導入オリゴヌクレオチドを調製した。このマレイミド基導入オリゴヌクレオチドを、SH基導入IgGと37℃で1時間反応させ、次いでUltrogel ACA34 (Biosepra社製)にアプライし、ペア8-標識ウサギIgGを調製した。

【0054】

〔実施例3〕

金コロイド標識ストレプトアビジンの調製

粒径40nmの金コロイド (530nmにおける吸光度) 5mlと150ugストレプトアビジン (ベクター社製)を含む2mMホウ酸緩衝液pH9.0 1mlを混合して反応させた。この後、牛血清アルブミンを終濃度1%になるように添加してブロッキングを行い、遠心分離により金コロイド標識ストレプトアビジンを沈さとして回収し、牛血清アルブミン1%溶液で遠心洗浄を行い、同溶液で沈さを懸濁して、金コロイド標識ストレプトアビジンを調製した。

【0055】

〔実施例4〕

オリゴヌクレオチド標識ストレプトアビジンの調製

ストレプトアビジン 2 mg を溶解した 0.2 M ホウ酸緩衝液 pH 8.0 1 ml に、ストレプトアビジンの 100 倍モル過剰の SATA を添加して、37℃で 1 時間反応させた。その後、終濃度 0.1 M Tris、および 0.1 M ヒドロキシルアミンとなるように試薬を添加して、37℃で 30 分反応させた。この後、Sephadex G-25 にアプライし、SH 基導入ストレプトアビジンを得た

。一方、ペア 8+ 216 nmol を溶解した、5 mM EDTA を含む 0.1 M MOPS 緩衝液 pH 7.0 に、オリゴヌクレオチドの 100 倍モル過剰の EMC S を添加し、37℃で 1 時間反応させた。反応後、常法に従ってエタノール沈殿、洗浄を行い、マレイミド基導入オリゴヌクレオチドを導入した。このマレイミド基導入オリゴヌクレオチドを、SH 基ストレプトアビジンと 37℃で 1 時間反応させ、次いで Ultrogel AcA 34 にアプライし、ペア 8+ 標識ストレプトアビジンを調製した。

【0056】

〔実施例 5〕

HCV core 3 ペプチド結合金コロイド標識ストレプトアビジンの調製

前記実施例 3 で調製した金コロイド標識ストレプトアビジン 200 μ l とピオチン導入 HCV core 3 ペプチド（イノジェネティクス社製） 5 μ l を混合して 37℃で 1 時間反応させた後、金コロイド複合体を遠心分離により沈さとして回収し、牛血清アルブミン 1% 溶液で遠心洗浄を行い、同溶液で沈さを懸濁して、HCV core 3 ペプチド結合金コロイド標識ストレプトアビジンを調製した。

【0057】

〔実施例 6〕

HCV core 3 ペプチド結合オリゴヌクレオチド標識ストレプトアビジンの調製

前記実施例 4 で調製したオリゴヌクレオチド標識ストレプトアビジン 200 μ g に前記実施例 5 で使用したピオチン導入 HCV core 3 ペプチド 56 μ g を混合して 37℃で 1 時間反応させ、YM 30（ミリポア社製）を用いた限外濾

過を行い、HCV core 3 ペプチド結合オリゴヌクレオチド標識ストレプトアビジンを調製した。

【0058】

〔実施例 7〕

ペア 8-標識 IgG 結合ニトロセルロース膜の調製

前記実施例 2 で調製したペア 8-標識ウサギ IgG を 1 mg/ml となるように希釈して XY 3000 (商品名、バイオドット社製、テストストリップ製造用 XY 分注システム) に充填し、PET で裏打ちをしたニトロセルロース膜 (md i 社製) に塗布した。乾燥後、ブロックエース (商品名、雪印乳業社製、ブロッキング剤) で室温、3 時間ブロッキングを行い、精製水で洗浄後、乾燥させた。この後、一端にセルロース製濾紙 (ワットマン社製 WF 1. 5 あるいは md i 社製) を貼り付け、もう一端にはコンジュゲートリリースパッド (md i 社製、ガラスフィルター) を貼り付けた (一部は 2 重になるようにした)。これを幅 5 mm になるように切断し、ハウジングに格納した。

【0059】

〔実施例 8〕

HCV 抗体陽性血清での反応性

前記実施例 5 で調製した HCV core 3 ペプチド結合金コロイド標識ストレプトアビジン 5 μ l と前記実施例 6 で調製した HCV core 3 ペプチド結合オリゴヌクレオチド標識ストレプトアビジン 150 ng、4.4% Tween 80、44 mM EDTA を含む溶液 11.5 μ l に、HCV 抗体陽性血清を 100 μ l 添加し、混合して素早く、前記実施例 7 で調製したペア 8-標識 IgG 結合ニトロセルロース膜の試料添加窓に添加した。15 分後ペア 8-標識 IgG を塗布した部位に金コロイドの赤紫色のラインが観察された。一方、対照として HCV 抗体が含まれていないことがわかっている血清を添加した場合は、ラインが観察されなかった。以上の結果より、リガンドに対する特異的な抗体が含まれることが本発明の方法により判定できることが確認できた。

【0060】

〔実施例 9〕

金コロイド標識TP抗原の調製

40nmの粒径の金コロイド5mlと100ugの遺伝子組み換え操作により得られたTP17K抗原（Lee Labs社製）を含む2mMホウ酸緩衝液pH9.0 1mlを混合して反応させた。この後、牛血清アルブミンを終濃度1%になるように添加してブロッキングを行い、遠心分離により金コロイド標識TP抗原を沈さとして回収し、牛血清アルブミン1%溶液で遠心洗浄を行い、同溶液で沈さを懸濁して、金コロイド標識TP抗原を調製した。

【0061】

〔実施例10〕

オリゴヌクレオチド標識アビジンの調製

アビジン10mgを溶解した0.1Mリン酸緩衝液pH7.0 1mlに、アビジンの100倍モル過剰のEMCSを添加して、37℃で1時間反応させた。この後、Sephadex G-25にアプライし、マレイミド基導入アビジンを得た。一方、ペア8+375nmolを溶解した、5mMEDTAを含む0.1MMOPS緩衝液pH7.0に、オリゴヌクレオチドの100倍モル過剰のSATAを添加し、37℃で1時間反応させた。反応後、終濃度0.1MTris、および0.1Mヒドロキシルアミンとなるように試薬を添加して、37℃で30分反応させた。次いで常法に従ってエタノール沈殿、洗浄を行い、SH基導入オリゴヌクレオチドを調製した。このSH基導入オリゴヌクレオチドを、マレイミド基アビジンと37℃で1時間反応させ、次いでUltrogel AcA44にアプライし、ペア8+標識アビジンを調製した。

【0062】

〔実施例11〕

ビオチン標識TP17K抗原の調製

500ugのTP17K抗原（イノジェネティクス社製）と5mMEDTAを含む0.1Mリン酸緩衝液pH7.0 0.5mlに、TP17K抗原の100倍モル過剰のNHS-biotin（ピラス社製）を添加して37℃で1時間反応させ、反応後Sephadex G-25カラムにアプライして、ビオチン標識TP17K抗原を調製した。TP17K抗原の回収率は、75%であった。

【0063】

〔実施例 1 2〕

ビオチン化 TP 1 7 K 抗原とオリゴヌクレオチド標識アビジンの反応によるオリゴヌクレオチド標識 TP 1 7 K 抗原の調製

前記実施例 1 0 で調製したオリゴヌクレオチド標識アビジンと前記実施例 1 1 で調製したビオチン標識 TP 1 7 K 抗原をモル比で、それぞれ 1 : 8、1 : 4、1 : 2、1 : 1、1 : 0. 5 という混合比で 3 7℃ で 3 0 分間反応させ、4℃ に保存した。

【0064】

前記実施例 1 0 で調製したオリゴヌクレオチド標識アビジンと前記実施例 1 1 で調製したビオチン標識 TP 1 7 K 抗原を混合しているだけであるので、TP 1 7 K 抗原の回収率は、7 5 % であった。

【0065】

〔実施例 1 3〕

種々の混合比時のオリゴヌクレオチド標識 TP 1 7 K 抗原の反応性

前記実施例 1 2 で調製した、種々の混合比時のオリゴヌクレオチド標識 TP 1 7 K 抗原の反応性を評価した。すなわち、前記実施例 9 で調製した金コロイド標識 TP 抗原を 5 u l、ビオチン 1 m g / m l を 5 u l、TP 抗体陰性血清 9 0 u l に、前記実施例 1 2 で調製したオリゴヌクレオチド標識 TP 1 7 K 抗原をそれぞれ 2 u l 添加した。この反応系を 2 本調製し、ここに TP 抗体陽性血清を一方には添加し、もう一方には添加せずに、それぞれ速やかに混合し、前記実施例 7 で調製したペア 8 - 標識 I g G 結合ニトロセルロース膜を格納したハウジングの試料添加窓に全量をそれぞれアプライした。

【0066】

アプライ後 2 0 分後の、陽性検体でのラインの濃さは、1 : 2 のものが最も濃く、次いで 1 : 4 と 1 : 1 がほぼ同等、これに次いで、1 : 0. 5、1 : 8 という順であった。一方 TP 抗体陰性血清を添加したものはいずれの混合比であってもラインは出現しなかった。

【0067】

この成績は、オリゴヌクレオチド標識アビジンとビオチン標識抗原の混合比を変化させることによって、容易に検出感度を変化させることが可能であることを示している。

【0068】

〔実施例 14〕

HBs 抗原検出用のオリゴヌクレオチド標識 IgG の調製

ウサギ IgG にペア 1- を導入した。方法は、前記実施例 2 と同様にした。

【0069】

〔実施例 15〕

HBs 抗原検出用のオリゴヌクレオチド標識マウス抗 HBs-Fab' の調製
モノクローン抗 HBs-IgG 10mg を含む 0.1M クエン酸緩衝液 pH 3.5 に、IgG の 5% になるようにペプシン（ベーリンガー・マンハイム社製）を添加して 37℃ で一定時間反応させた。反応後、0.1M リン酸緩衝液 pH 6.0 で平衡化した Ultrogel AcA44（商品名、バイオセプラ社製）カラムにアプライし、F(ab')₂ 画分を収集した。

【0070】

この F(ab')₂ 5.2mg を YM30（ミリポア社製）による限外濾過で濃縮後、終濃度 0.1M になるようにメルカプトエチルアミン（ナカライテスク社製）を添加して、37℃ で 90 分間還元した。この後、Sephadex G-25 カラム（商品名、アマシャムファルマシアバイオテック社製）にアプライしてマウス抗 HBs-Fab' 2.6mg を得た。

【0071】

一方ペア 1 + 191nmol を溶解した 5mMEDTA を含む 0.1M MOPS 緩衝液 pH 7.0 に、オリゴヌクレオチドの 100 倍モル過剰の EMCS を添加し、37℃ で 30 分反応させた。反応後、常法に従ってエタノール沈殿、洗浄を行い、マレイミド基導入オリゴヌクレオチドを調製した。

【0072】

このマレイミド基導入オリゴヌクレオチドを、マウス抗 HBs-Fab' と 37℃ で 1 時間反応させ、次いで Ultrogel AcA44 にアプライし、ペ

ア1+標識マウス抗HBs-Fab'を調製した。

【0073】

〔実施例16〕

HBs抗原-TP抗体を同時に検出するためのニトロセルロース膜の調製

前記実施例2で調製したペア8-標識ウサギIgGと前記実施例14で調製したペア1-標識ウサギIgGを1mg/mlとなるように希釈して、それぞれXY3000（商品名、バイオドット社製）に充填し、PETで裏打ちをしたニトロセルロース膜に、ペア1-は原点より30mmの位置に、ペア8-は原点より35mmの位置にそれぞれ塗布した。乾燥後、ブロックエース（商品名、雪印乳業社製）で室温、3時間ブロッキングを行い、精製水で洗浄後、乾燥させた。この後、一端にセルロース製濾紙（ワットマン社製WF1.5あるいはmdi社製）を貼り付け、もう一端にはコンジュゲートリリースパッド（アドバンスドマイクロデバイス社製）を貼り付けた（一部は2重になるようにした）。これを幅5mmになるように切断し、ハウジングに格納した。

【0074】

〔実施例17〕

HBs抗原-TP抗体を同時に独立して検出できるかどうかの検討

HBs抗原-TP抗体を同時に独立して検出できるかどうかの検討を次のようにして行った。すなわち、前記実施例9で調製した金コロイド標識TP抗原を5ul、ビオチン1mg/mlを5ul、TP抗体及びHBs抗原陰性血清90ulに、前記実施例12で調製した1:4の混合比で調製したオリゴヌクレオチド標識TP17K抗原を10倍希釈しその溶液を1ul添加した。これに前記実施例15で調製したオリゴヌクレオチド標識マウス抗HBs-Fab'を90ng添加し、金コロイド標識抗HBs抗体（ブリティッシュバイオセル インターナショナル社製）を9ul添加した。この反応系を4本調製し、ここにTP抗体陽性血清5ulを一方には添加し、1本にはTP抗体陰性、HBs抗原陰性血清を5ul添加し、さらに、HBs抗原50ng/mlおよび220ug/mlをそれぞれ含む血清をそれぞれ5ul速やかに混合し、前記実施例16で調製したペア8-標識ウサギIgG結合およびペア1-標識ウサギIgG結合ニトロセルロ

ース膜を格納したハウジングの試料添加窓に全量をそれぞれアプライした。

【0075】

アプライ後20分の判定で、TP抗体陰性、HBs抗原陰性血清を添加したものは、両方のラインは出現せず、TP抗体陽性血清を添加したものはペア8-が塗布した部分のみに、また、HBs抗原を添加したものはペア1-が塗布された部分のみにラインが出現し、それぞれの項目が同じニトロセルロース膜上で独立して検出できた。

【0076】

〔実施例18〕

ビオチン標識TP17K抗原の調製

500ugのTP17K抗原(Lee Labs社製)と5mMEDTAを含む0.1Mリン酸緩衝液pH7.0 0.5mlに、TP17K抗原の100倍モル過剰のNHS-biotinを添加して37℃で1時間反応させ、反応後Sephadex G-25カラムにアプライして、ビオチン標識TP17K抗原を調製した。TP17K抗原の回収率は、75%であった。このビオチン標識TP17K抗原は、前記実施例12に記載したように、前記実施例10で調製したオリゴヌクレオチド標識アビジンと混合するだけであるので、最終的な回収率は75%であった。

【0077】

〔比較例〕

TP17K抗原の直接標識によるオリゴヌクレオチド標識TP17K抗原の調製

TP17K抗原(Lee Labs社製)473μgと5mMEDTAを含む0.1Mリン酸緩衝液pH7.4に、TP17K抗原の20倍モル過剰のSAT Aを添加し、37℃で90分反応させ、この後ヒドロキシルアミン、トリス緩衝液を添加して反応させた。次いでSephadex G-25カラム(商品名、アマシウムファルマシアバイオテク社製)にアプライし、SH基導入TP17K抗原200μg(回収率42.2%)を得た。一方、ペア7+ 133nmol、5mMEDTAを含む0.1M MOPS緩衝液pH7.85に、ペア7+の

200倍モル過剰のEMCSを添加して、37℃で2時間反応させた。その後、常法によりオリゴヌクレオチドをエタノール沈殿、洗浄し、マレイミド基導入オリゴヌクレオチド105nmolを得た。

【0078】

SH基導入TP17K抗原200μgとマレイミド基導入オリゴヌクレオチド105nmolを混合し、37℃で2時間反応させた。その後、Ultragel AcA44カラムにアプライし、オリゴヌクレオチド標識TP17K抗原150μg（回収率32%）を得た。

【0079】

前記実施例18と比較例を比較すると、比較例は、回収率が32%であるのに対して、実施例18の方が回収率は75%と大幅に改善されることがわかった。

【0080】

【発明の効果】

本発明の検出又は測定のためのキット及びその検出又は測定方法によれば、試薬の感度をコントロールすることができる。

【0081】

例えば、本発明のキットは、受容体I及び受容体II当たりのリガンドL1又はリガンドL2の量を調整することができる。このことにより、測定感度の調整が可能となる。

【0082】

本発明のキットにおいては、物質R1又はR2としてのアビジン又はストレプトアビジンは物質B1としてのビオチンとの結合部位を1分子あたり4個保有しているため、リガンドLの導入比を、アビジン又はストレプトアビジン当たり1から4個の間で変化させることが可能である。したがって、この導入率を制御することにより反応性、感度をコントロールすることも可能となる。さらに、この感度のコントロールは、化合物L-B1-R2-Mと化合物L-B1-R1-B2の双方に行えるので、きめ細かい感度のコントロールが可能となる。

【0083】

結合子B3及び被結合子R3として、種々の結合性の異なる組み合わせの物質

を選択することにより、結合性の強弱を変化させることができ、即ち、試薬の感度をコントロールすることができる。

【0084】

結合子B3と被結合子R3として、少なくとも一部が相補的な配列をもつRNA、DNAのオリゴヌクレオチドを使用する場合には、オリゴヌクレオチドの長短を変化させることにより、結合性の強弱をコントロールすることができる。

【0085】

本発明の検出又は測定のためのキット及びその検出又は測定方法によれば、固相化させるための結合子B3及び被結合子R3にRNA又はDNA等のオリゴヌクレオチドを用い、少なくとも一部の相補的結合により複合体を固相に結合させる場合には、オリゴヌクレオチドの配列を変化させた複数種のものが使用できるので、それぞれの種類に対応させた複数の分析対象物を同時に測定することが可能になる。

【0 0 8 6】

【配列表】

Sequence Listing

<110> Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.

<120> Kit for detection or measurement of material to be measured and
method for detection or measurement

<130> NSM0037

<160> 5

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<223> The oligonucleotide with the amino group in the 5' terminal.

<400> 1

gaattcccgg ggatccgtcg 20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<223> The oligonucleotide with the amino group in the 5' terminal.

<400> 2

cgacggatcc ccgggaattc 20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<223> The oligonucleotide with the amino group in the 5' terminal.

<400> 3

aacggaatct aatcaggagg 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<223> The oligonucleotide with the amino group in the 5' terminal.

<400> 4

cctcctgatt agattccgtt 20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<223> The oligonucleotide with the amino group in the 5' terminal.

<400> 5

ccgactacag aagaggagaa 20

【図面の簡単な説明】

【図 1】

本発明の 1 番目の型式のキットの構成成分を図示したものである。

【図 2】

図 1 のキットを用いて被測定物質 A を固相に捕獲した状態を示す。

【図 3】

本発明のキットのうちの試薬成分を製造するためのフロー図であり、詳しくは、化合物 L 1 - B 1 - R 1 - M で表される受容体 I と、化合物 L 2 - B 2 - R 2 - B 3 で表される受容体 II の調製フロー図である。

【図 4】

本発明の 2 番目の型式のキットの構成成分を図示したものである。

【図 5】

図 4 のキットを用いて被測定物質 A を固相に捕獲した状態を示す。

【図 6】

本発明の 3 番目の型式のキットの構成成分を図示したものである。

【図 7】

図 6 のキットを用いて被測定物質 A を固相に捕獲した状態を示す。

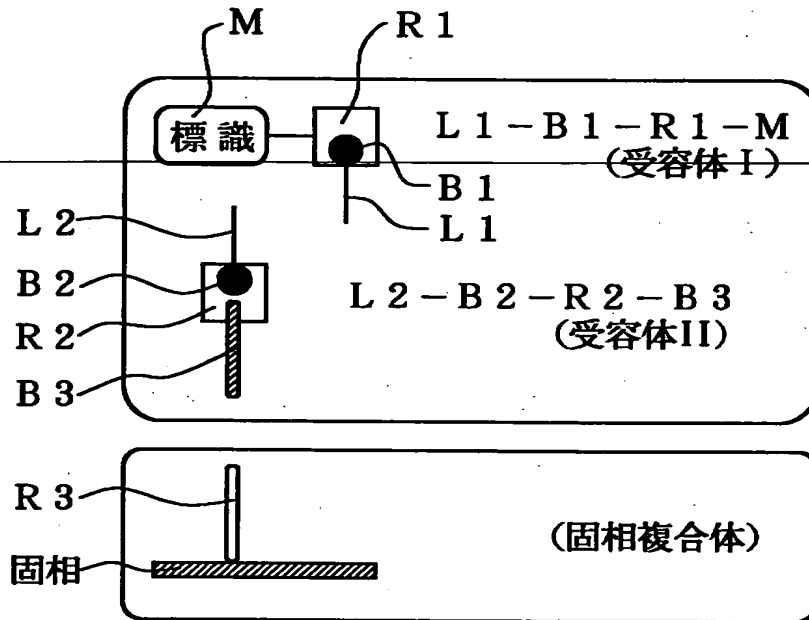
【図 8】

リガンド L 1 とリガンド L 2 が異なる配列を持つ物質である場合の本発明のキットを用い、被測定物質 A と反応させ、受容体 I、受容体 II 及び被測定物質からなる複合体を固相複合体に捕獲した状態を示す。

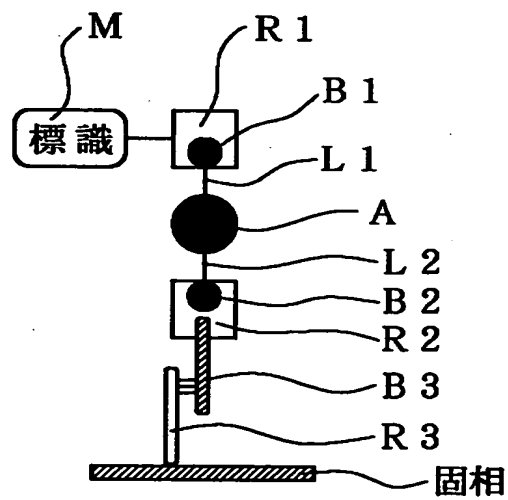
【書類名】

図面

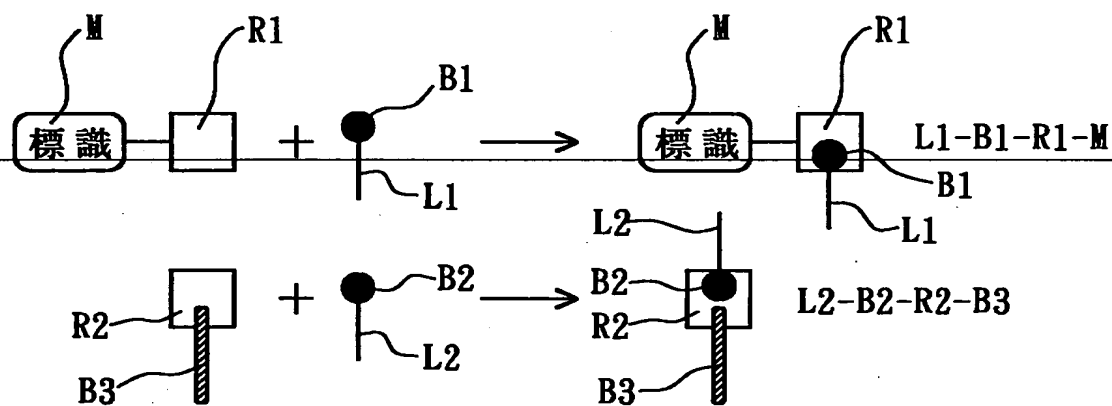
【図 1】



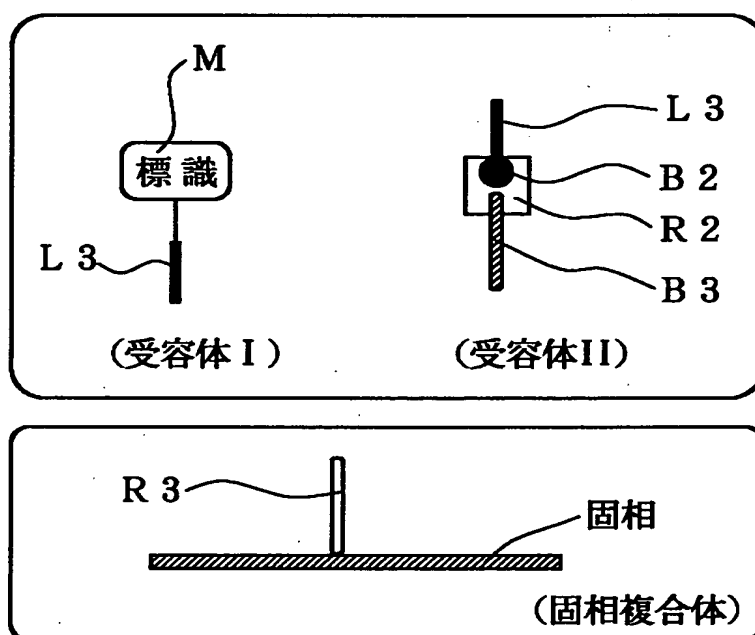
【図 2】



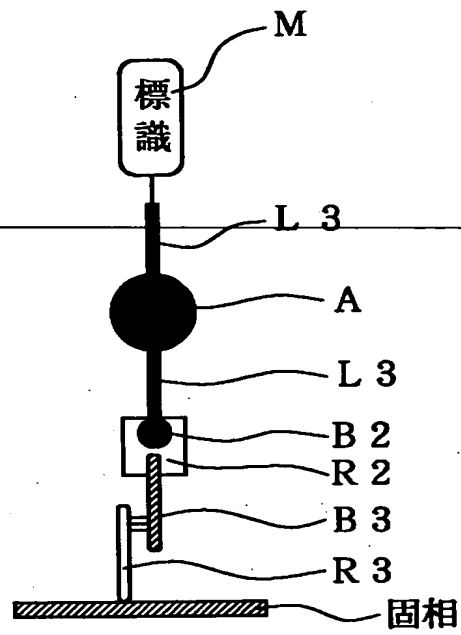
【図 3】



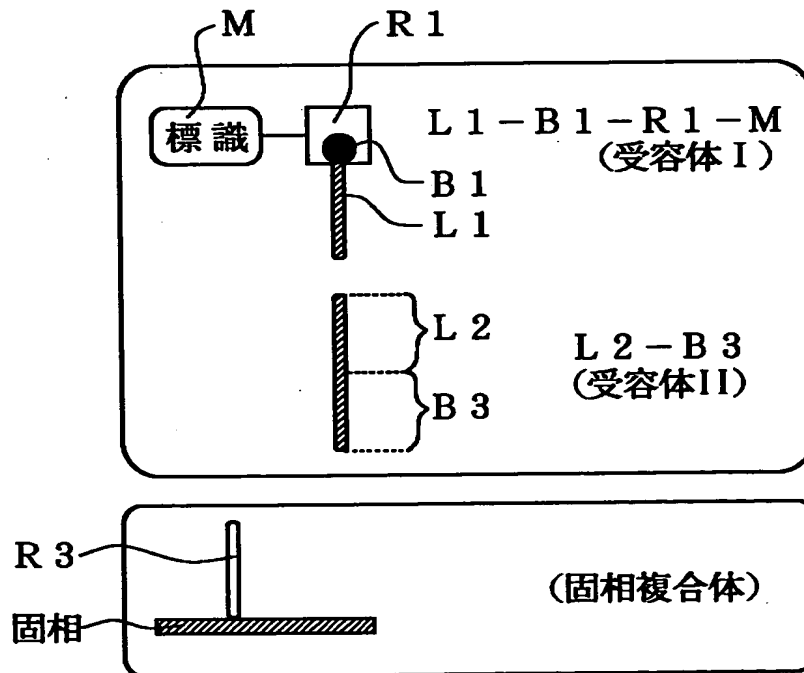
【図 4】



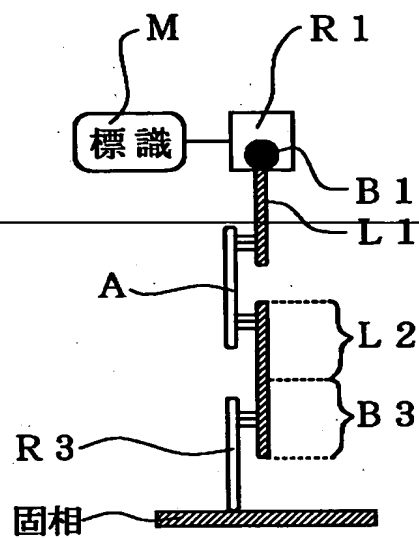
【図 5】



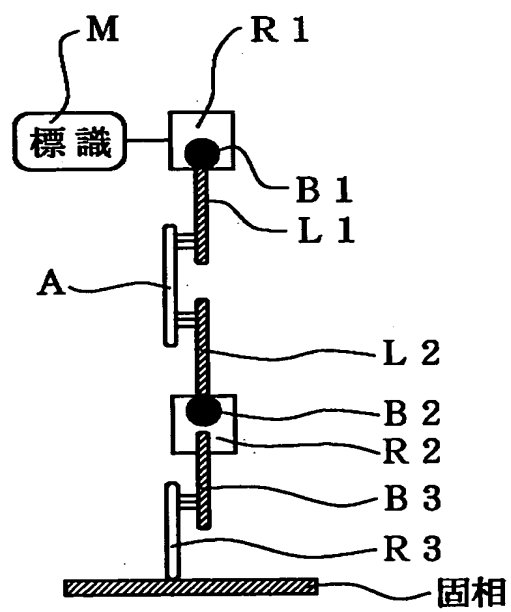
【図 6】



【図 7】



【図 8】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 キットを製造する際の収率が高く、低分子量のリガンドや、高分子量のリガンドであっても容易に標識することができ、試薬の感度をコントロールすることができるキット、及びその製造方法を提供する。

【解決手段】 リガンドL1に対して2価以上の結合性を有する被測定物質

Aを検出あるいは測定するためのキットであって、下記の受容体I、下記の受容体II、並びに受容体I、受容体II及び被測定物質からなる複合体を捕獲するための下記の固相複合体を包含するキット。受容体I：物質B1に結合性を有する物質R1にマーカ-Mを結合させてなるR1-Mと、リガンドL1と物質B1からなるL1-B1を結合させたL1-B1-R1-M。受容体II：被測定物質Aとは異なる結合性を有する物質B2をリガンドL2に導入したL2-B2と、物質B2に対して結合性を有する物質R2にB2とは異なる結合性の結合子B3を結合させてなるR2-B3を予め結合させて得られたL2-B2-R2-B3。固相複合体：結合子B3に対して結合性を有する被結合子R3を固相に結合させてなるR3-固相。

【選択図】 図1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000226862]

1. 変更年月日	1990年 8月 7日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都豊島区巣鴨2丁目11番1号
氏 名	日水製薬株式会社

THIS PAGE BLANK (USPTO)

THIS PAGE BLANK (USPTO)